

## Caractères morphologiques et chimiques des graines de *Melaleuca quinquenervia* S.T. Blake (*Myrtaceae*) de Madagascar

J. VIANO, P.A.R. RAMANOELINA, J.P. BIANCHINI & E.M. GAYDOU

**Résumé** : Les graines de quatre chémotypes de *Melaleuca quinquenervia* en provenance de Madagascar ont été étudiées sur le plan morphologique et chimique. Des investigations au M.E.B. ont précisé les caractères morphologiques, notamment l'ornementation du test. Sur le plan chimique, les recherches ont concerné la teneur en lipides et la composition en acides gras. L'ensemble des résultats n'a pas révélé de différences significatives à valeur diagnostique entre les quatre chémotypes établis à partir de la composition chimique des huiles essentielles.

**Summary** : Seeds of *Melaleuca quinquenervia* from Madagascar were analysed for their morphological and chemical characteristics. Investigations with S.E.M. precised morphological structures in particular for seed-coat ornamentation. Lipids and fatty acid compositions were also determined. These different results were discussed in relation to the four chemotypes already proposed following the chemical composition of these essential oils.

*Josy Viano et E. M. Gaydou, Laboratoire de Phytochimie, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France.*

*P. A. R. Ramanoelina et J. P. Bianchini, Département IAA, ESSA, Université d'Antananarivo, BP 175, 101 Antananarivo, Madagascar.*

Compte-tenu de l'intérêt représenté par l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Melaleuca quinquenervia* S.T. Blake, communément appelé « Niaouli », il nous a paru utile d'étudier la fraction lipidique des graines qui pourrait constituer un sous-produit valorisable.

Cette étude chimique nous a amené à préciser la définition des caractères morphologiques de ces graines (forme générale, dimensions, ornementation du test). L'analyse de ces critères taxonomiques a été réalisée notamment par des investigations au M.E.B. L'existence de 4 chémotypes révélée par nos recherches antérieures sur les huiles essentielles (RAMANOELINA et al., 1992) justifiait l'approfondissement de nos recherches dans le domaine de la Taxonomie.

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Les graines ont été prélevées sous loupe binoculaire à partir de fruits capsulaires mûrs de plusieurs chémotypes récoltés à Madagascar (Fig.1).

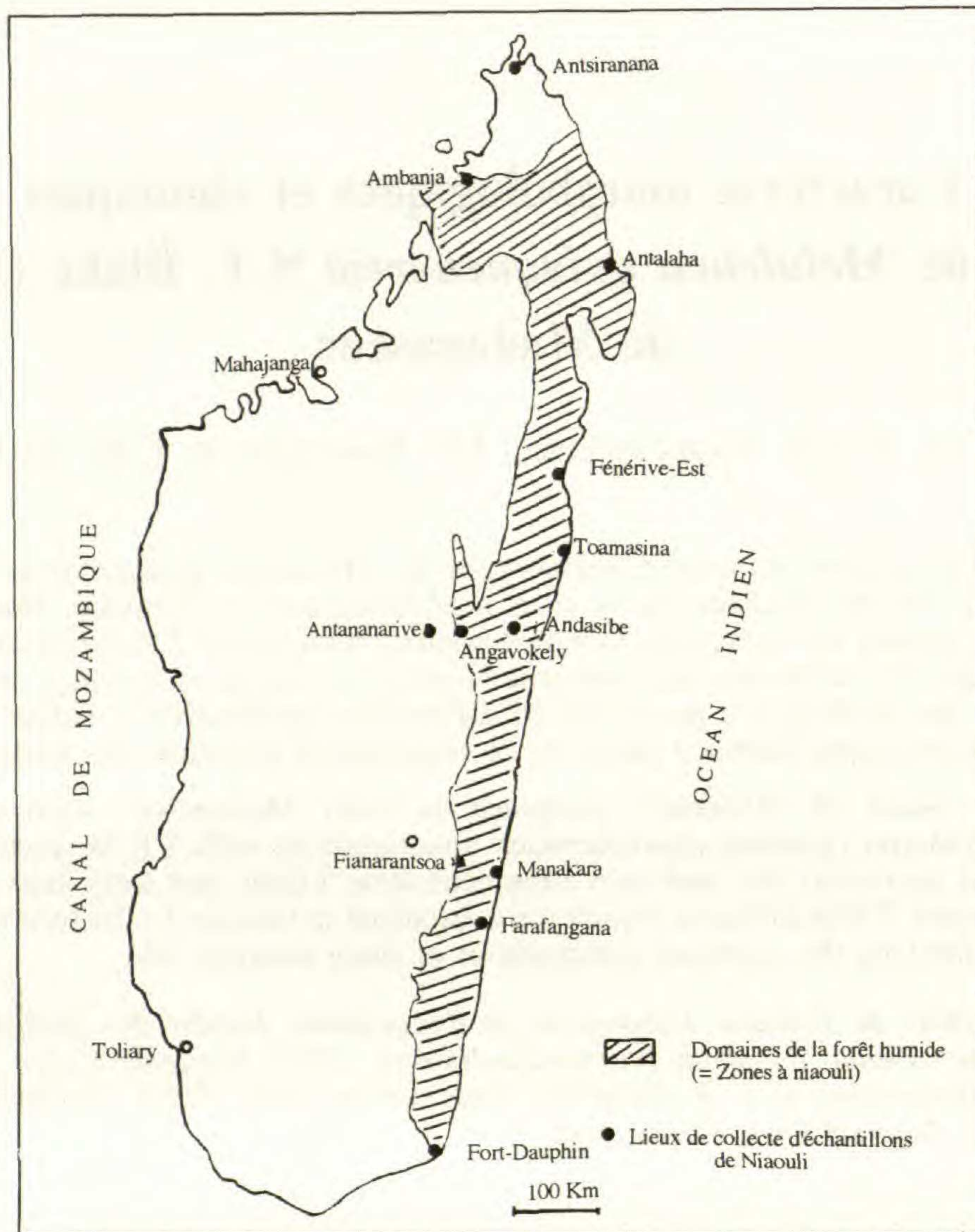


Fig. 1. — Localisation des échantillons étudiés de *Melaleuca quinquenervia* dans l'île de Madagascar.

Ces graines ont ensuite été nettoyées par immersion dans l'alcool, séchées, conservées à l'abri de la pollution atmosphérique, puis collées sur une bande de scotch double face sur des plots (environ 15 graines par plot). Les échantillons ont ensuite été métallisés à l'or rouge pendant 4 minutes.

Les microphotographies ont été réalisées sur un microscope électronique à balayage JEOL — JSM 35 CF du Centre commun de Microscopie électronique de la Faculté de Médecine de Marseille.

#### TENEUR EN HUILES

Vingt-quatre échantillons de graines appartenant aux quatre chémotypes ont été analysés.

La teneur en huile des graines a été déterminée par extraction au Soxhlet avec de l'hexane suivant la norme NFT 03.905 (Afnor, 1988). Les teneurs en acides gras et insaponifiable ont

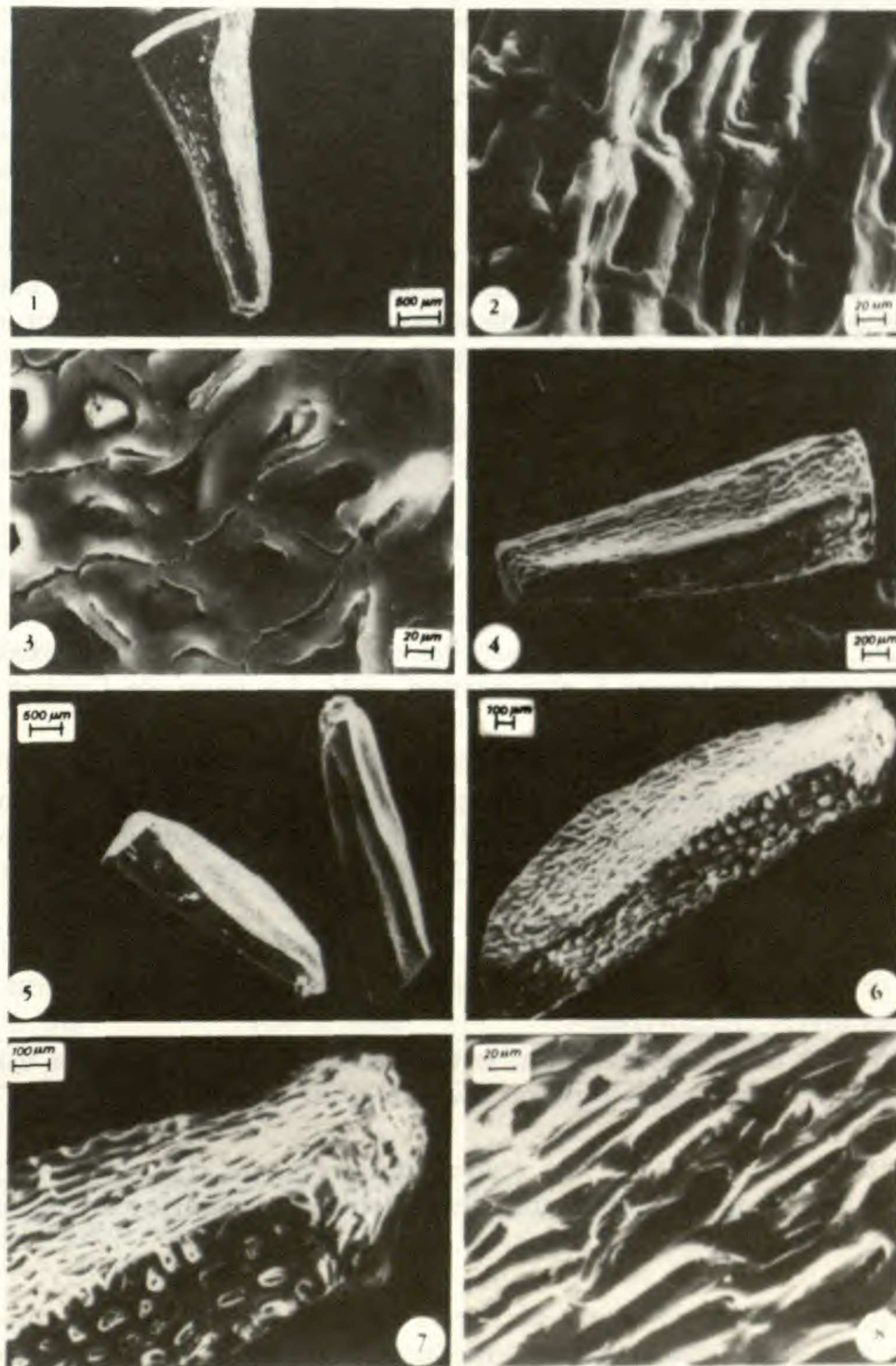


Fig. 2. — Graines de *Melaleuca quinquenervia* : 1, chémotype I, vue d'ensemble  $\times 66$  ; 2, chémotype I, détail du test de la zone centrale  $\times 1000$  ; 3, chémotype I, détail du plateau  $\times 1000$  ; 4, chémotype II, vue d'ensemble  $\times 94$  ; 5, chémotype III, vue d'ensemble de 2 graines  $\times 46$  ; 6, chémotype IV, vue d'ensemble  $\times 130$  ; 7, chémotype IV, détail de la zone du plateau  $\times 260$  ; 8, chémotype IV, détail de la région moyenne  $\times 1000$ .

été déterminées suivant la norme NFT 60.205 (Afnor, 1988) : après saponification de l'extrait lipidique, l'insaponifiable est extrait à l'hexane de la solution savonneuse. Les acides gras régénérés par acidification du milieu sont transformés en esters méthyliques suivant la méthode utilisée par notre laboratoire (VIANO & GAYDOU, 1984). La séparation des esters méthyliques a été réalisée en utilisant un appareil de chromatographie en phase gazeuse Girdel 30 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire en silice fondue de 25 m (d.i. 0,32 mm) imprégnée de Carbowax 20M (épaisseur de plan 0,15 µm). Les températures étaient : four 190°C, détecteur et injecteur 220°C. La pression d'hélium à l'entrée de la colonne était de 0,6 bar. Pour l'identification des esters méthyliques, des huiles végétales connues ont été utilisées comme références. Les longueurs de chaînes équivalentes (LCE) sont en accord avec celles trouvées précédemment (BIANCHINI et al., 1981).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les graines à embryon droit sont enfermées dans une capsule loculicide. Ce caractère de type de fruit capsulaire permet de définir la sous-famille des *Leptospermoideae* à laquelle appartient le genre *Melaleuca*.

L'ovaire semi-infère formé de trois carpelles concrescents avec le réceptacle est pluriloculaire avec des ovules anatropes à placentation axile. La paroi de l'ovaire est fortement pubescente.

Les graines sont appliquées l'une sur l'autre comme des tuiles se recouvrant partiellement de haut en bas. Il en résulte un certain écrasement qui modifie la forme de la graine. Les graines sont en forme de pyramide tronquée (Fig. 2, 1, 4, 7, 8). A la base de la pyramide, on observe un plateau à surface plus ou moins plane. La forme de la graine est constante chez les 4 chémotypes examinés.

Les graines sont petites, longues de 1 mm et larges de 0,2 à 0,4 mm. Les faibles variations de dimensions ne peuvent être prises en considération pour établir des critères taxonomiques valables entre les divers chémotypes.

Du point de vue de l'ornementation, le test des graines est à surface lisse, formé d'un réseau de cellules rectangulaires à paroi épaissie avec une partie centrale profondément déprimée (Fig. 2, 2, 3, 5, 6).

Il serait intéressant de mener une étude similaire au M.E.B. sur d'autres espèces de *Melaleuca*, car à l'heure actuelle, il est difficile d'attribuer une valeur taxonomique à ce type d'ornementation.

Les résultats concernant la teneur en lipides neutres des graines sont rassemblés dans le Tableau 1. On peut noter que celle-ci est faible (1,3-1,6 %) et varie peu d'un chémotype à l'autre. Dans tous les cas, la fraction lipidique obtenue est de couleur marron à fond vert foncé et elle se présente sous une forme concrète à la température ambiante.

La très forte teneur en insaponifiable (50-53 %) constitue un point remarquable de ces lipides. En effet, les extraits lipidiques de graines à usage alimentaire ont une teneur en insaponifiable qui est comprise entre 1 et 3 % maximum.

Les différents acides gras de la fraction triglycéridique ont été séparés et dosés sous forme d'esters méthyliques en utilisant une colonne capillaire imprégnée de Carbowax 20 M. Ils ont

été identifiés à partir de leurs longueurs de chaînes équivalentes (LCE) suivant une méthode classique (BIANCHINI et al., 1981 ; VIANO & GAYDOU, 1984). Les résultats obtenus pour 24 échantillons appartenant aux 4 chémotypes sont rassemblés dans le Tableau 2. Ces acides gras vont de l'acide myristique (14 : 0), à l'état de trace dans tous les échantillons, à l'acide lignocérique (24 : 0) dont la concentration moyenne ne dépasse pas 2,3 %. Parmi les autres acides gras saturés, les acides palmitique (16 : 0) (13,5-17,7 %), stéarique (18 : 0) (4,0-5,0 %), arachidique (20 : 0) (1,2-1,4 %) et béhénique (22 : 0) (1,7-2,5 %) sont les plus importants. Les acides mono insaturés principaux sont les acides palmitoléique (16 : 1 n-7) (0,7-2,0 %) et oléique (18 : 1 n-9) (14,0-15,7 %). Parmi les acides gras polyinsaturés, c'est l'acide linoléique (18 : 2 n-6) qui est de loin l'acide gras majoritaire avec 51,8-60,0 %, l'acide linoléique (18 : 3 n-3) ne représentant que 1,9-4,3 %. Nous avons noté la présence de l'acide isostéarique (i 18 : 0) à de faible concentration (0,7-1,2 %).

L'étude statistique des compositions en acides gras ne révèle pas une différence significative en fonction des 4 chémotypes observés à partir de la composition chimique de l'huile essentielle. Ces huiles fortement insaturées se rapprochent de la composition en acides gras de lipides de graines comme celles de maïs ou de tournesol qui sont généralement fluides à température ambiante. L'état solide que nous constatons, dans le cas des lipides neutres des graines de niaouli, est dû probablement à la forte teneur en insaponifiable. L'étude de cette fraction fera l'objet d'un prochain article.

TABLEAU 1 : Teneurs en lipides, acides gras et insaponifiable des graines de *Melaleuca quinquenervia* étudiées.

CHÉMOTYPE	EXTRAIT LIPIDIQUE <sup>a</sup>	ACIDES GRAS <sup>b</sup>	INSAPONIFIABLE <sup>b</sup>
I	1,32 ± 0,57 <sup>c</sup>	48,0	52,0
II	1,53 ± 0,48 <sup>d</sup>	46,6	53,4
III	1,50 ± 0,42 <sup>e</sup>	50,3	49,7
IV	1,57 ± 0,63 <sup>e</sup>	49,5	50

- a. Exprimé en % pondéral par rapport aux graines séchées
- b. Exprimé en % pondéral par rapport à l'extrait lipidique
- c. Moyenne de 11 échantillons
- d. Moyenne de 3 échantillons
- e. Moyenne de 5 échantillons

## CONCLUSION

L'examen approfondi du test des graines au M.E.B. a permis de préciser l'ornementation et de définir ainsi un caractère taxonomique fiable pour la détermination du *Melaleuca quinquenervia* de Madagascar. L'étude comparative des graines des quatre chémotypes observés à partir de la composition chimique de l'huile essentielle n'a toutefois pas abouti à l'établissement de critères taxonomiques nécessaires à leur identification.

TABLEAU 2 : Composition en acides gras des 24 échantillons de graines de Niaouli étudiés<sup>a</sup>

Acides gras	CHÉMOTYPE I <sup>b</sup>				CHÉMOTYPE II <sup>c</sup>				CHÉMOTYPE III <sup>d</sup>				CHÉMOTYPE IV <sup>d</sup>			
	min.	max.	moy.	ec-ty	min.	max.	moy.	ec-ty	min.	max.	moy.	ec-ty	min.	max.	moy.	ec-ty
16 : 0	12,44	27,40	17,30	4,83	11,60	14,60	13,50	1,37	12,90	22,80	16,00	3,51	14,80	22,80	16,90	3,00
16 : 1 n-7	0,69	2,28	1,30	0,51	0,64	0,79	0,70	0,06	0,89	2,17	1,33	0,50	0,77	3,12	2,04	0,77
i18 : 0	0,35	1,45	0,86	0,40	0,40	1,28	0,83	0,36	0,14	2,02	0,71	0,69	0,58	1,82	1,21	0,48
18 : 0	2,89	5,14	4,06	0,69	3,06	5,05	4,27	0,87	3,67	4,80	4,18	0,46	4,67	6,14	5,14	0,53
18 : 1 n-9	8,83	22,10	14,60	3,34	11,60	16,50	14,00	1,98	13,60	16,80	14,90	1,08	12,20	20,10	15,70	2,90
18 : 2 n-6	26,70	66,60	51,70	13,80	55,50	65,10	60,01	3,82	39,90	62,10	53,80	8,85	37,70	59,30	53,02	7,80
18 : 3 n-3	1,20	16,11	4,36	3,91	1,44	4,58	3,08	1,28	0,88	10,87	3,78	3,66	0,93	3,69	1,94	0,96
20 : 0	0,69	2,51	1,38	0,48	0,99	1,72	1,28	0,31	0,85	1,80	1,24	0,32	0,84	1,56	1,21	0,27
22 : 0	1,09	6,74	2,51	1,45	1,25	4,33	2,58	1,29	0,85	3,38	1,87	0,88	0,84	3,28	1,68	0,83
24 : 0	0,40	6,24	2,24	1,45	0,54	1,60	0,93	0,47	1,05	4,15	2,32	1,07	0,87	2,27	1,29	0,52

a. Pourcentage relatif des surfaces des pics obtenus par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (Carbowax 20M)

b. Moyenne de 11 échantillons

c. Moyenne de 3 échantillons

d. Moyenne de 5 échantillons

L'étude de la fraction lipidique des graines a révélé une forte teneur en insaponifiable qui est sans doute à l'origine de la forme concrète de cette huile. Sa composition en acides gras a ainsi été mise en évidence. L'étude comparative de la composition chimique des graines des quatre chémotypes n'a toutefois pas révélé de différences significatives.

## BIBLIOGRAPHIE

- Afnor, 1988. — *Recueil de Normes Françaises des Corps gras. Graines oléagineuses, Produits dérivés*. Paris.
- BIANCHINI, J.P., RALAIMANARIVO, A., & GAYDOU, E.M., 1981. — Determination of Cyclopropenoic and Cyclopropanoic Fatty Acids in Cottonseed and Kapok Seed Oils by Gas Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 53 : 2194-2201.
- RAMANOELINA, P.A.R., 1992. — *Etude de la variation de la composition chimique de l'huile essentielle de Niaouli de Madagascar*. Th. Doct., Marseille.
- RAMANOELINA, P.A.R., BIANCHINI, J.P., ANDRIANTSIFERANA, M., VIANO, J. & GAYDOU, E.M., 1992. — Chemical composition of Niaouli essential oils from Madagascar. *J. Essent. Oil. Res.* 4 : 657-658.
- VIANO, J. & GAYDOU, E.M., 1984. — Composition en acides gras et en stérols des huiles extraites des fruits de trois espèces récoltées dans le Massif du Lubéron : *Aphyllantes monspeliensis* L., *Ranunculus gramineus* L. et *Cornus sanguinea* L. *Rev. Fr. Corps gras* 4-5 : 195-197.